

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA
VIVIANE DE FÁTIMA MILCHESKI

**NODULAÇÃO EM VARIEDADES LOCAIS E CULTIVARES COMERCIAIS DE
FEIJÃO COMUM**

Curitibanos

2018

VIVIANE DE FÁTIMA MILCHESKI

**NODULAÇÃO EM VARIEDADES LOCAIS E CULTIVARES COMERCIAIS DE
FEIJÃO COMUM**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
em Agronomia do Campus de Curitibanos da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Agronomia.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Carolina da Costa
Lara Fioreze

Coorientadora: Profª. Dra. Glória Regina
Botelho

Curitibanos

2018

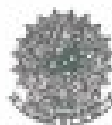
Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Milcheski, Viviane de Fátima
NODULAÇÃO EM VARIEDADES LOCAIS E CULTIVARES
COMERCIAIS DE FEIJÃO COMUM / Viviane de Fátima
Milcheski ; orientador, Ana Carolina da Costa Lara
Fioreze, coorientador, Glória Regina Botelho, 2018.
37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos,
2018.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Phaseolus vulgaris. 3. Rizóbios.
4. FBN. I. Fioreze, Ana Carolina da Costa Lara .
II. Botelho, Glória Regina . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia.
IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Dnyassu Saboará 143

CEP: 131 CEP: 89520-000 - Curitiba - SC

TELEFONE (048) 3721-2176 E-mail: agronomia.cob@contato.ufsc.br.

VIVIANE DE FÁTIMA MILCHESKI

Nodulação em variedades locais e cultivares comerciais de feijão comum

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitiba, 09 de novembro de 2018.

Profa. Dra. Elis Borcioni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Carolina da Costa Lara Fioreze
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Glória Regina Botelho
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leocir José Welter
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus estimados pais. Mãe, seu cuidado e dedicação, foi o que me muitos momentos me deram a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa senhora por me ampararem nos momentos difíceis, por me abençoarem colocando pessoas maravilhosas no meu caminho e por me protegerem a todo instante.

Agradeço aos meus pais, Terezinha Beatriz e Anísio Milcheski, por sempre me apoiarem, por serem meus exemplos de vida e por me levantar nos momentos que fui ao chão, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu irmão Vilson e minha cunhada que tenho como irmã Seia, por sempre me ajudarem e por terem dado o maior presente que já recebi, o de ser tia da Rafa, do Ikki e da Lavi, a esses anjinhos devo minha eterna gratidão por me fazerem sentir o que é o amor puro e verdadeiro.

A minha orientadora que considero também uma grande amiga Ana Carolina, não só por seus sábios ensinamentos, mas também por ser uma profissional na qual me espelho para o meu futuro. Assim como minha coorientadora e amiga Glória Regina, a quem agradeço por toda dedicação, paciência e sempre me motivar a nunca desistir.

Ao grupo de Pesquisa de Melhoramento Genético, aos meus amigos Janaína Lisot, José Filipe, Ana Rosa, Araceli, Emily, Erik, Hamilton, Samyra, Alice, João Pedro, Bibi, Victor, Felipe Bratti e ao professor Samuel, por me ajudarem incondicionalmente durante todas as vezes que implantei meu experimento.

Aos meus amigos Tati e Balbinott, por sempre me escutarem quando chegava em casa chorando por meu experimento ter dado errado, por todos os momentos incríveis que vivemos e claro pelas comidas do final de semana e a conta na Netflix.

Em especial a minha amiga Keli Kogliniski que mesmo estando longe sempre ajudou-me a secar as lágrimas e colocar um sorriso no rosto, me ensinando a tornar-me uma pessoa melhor. E também aos meus grandes amigos Sindi Senff e Robson Drun (Toninho), não somente por me ajudarem neste trabalho mas, por serem minha família nestes cinco anos de graduação, vocês ficarão para sempre em meu coração.

Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

“Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com minha mão direita vitoriosa”

Isaías, 12:10

RESUMO

No feijoeiro, o nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade, parte dessa necessidade se explica pelo alto teor de proteína encontrado no grão. Uma das principais fontes de fornecimento deste nutriente à planta é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). No feijão, as bactérias do gênero *Rhizobium* se associam simbioticamente, formando estruturas específicas na raiz, chamadas de nódulos, nos quais ocorre o processo de FBN. Com isso, objetivou-se verificar a diferença na capacidade de nodulação entre variedades locais e cultivares comerciais de feijão comum, inoculadas com bactérias do grupo Rizóbio e com isolados de nódulos de feijão comum, de solos de Curitibanos, Santa Catarina. O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (2x4), em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições onde cada repetição foi constituída de dois vasos. Foram avaliados genótipos de feijão com níveis de domesticação diferentes, sendo duas variedades locais (carioca e preto tradicional) e duas cultivares comerciais melhoradas (TAA Dama e IPR Tuiuiú), que foram inoculados com duas bactérias, uma estirpe comercial do gênero *Rhizobium*, sendo a CIAT899 e uma isolada de nódulos de feijão comum, em solos de Curitibanos, a CBRZ014. A semeadura se procedeu em vasos do tipo Leonard adaptados, irrigados com água destilada e autoclavada na base do vaso conforme a necessidade da cultura e após a queda dos cotilédones iniciou-se a aplicação de solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio. As avaliações iniciaram no florescimento pleno de cada genótipo de feijão. As avaliações consistiram em: massa de nódulos inviáveis, massa de nódulos viáveis, massa de nódulos total, porcentagem de nódulos viáveis, massa seca de raiz e parte aérea, massa seca total, teor foliar de nitrogênio, acúmulo de nitrogênio na parte aérea e relação raiz-parte aérea. Com relação aos resultados obtidos, foi possível observar que o isolado CBRZ 014 promoveu um maior desenvolvimento radicular em relação a CIAT 899, além de ter produzido uma quantidade de nódulos relativamente alta. As variedades locais se demonstraram mais eficientes na produção de nódulos viáveis e na produção de massa seca total, e a cultivar IPR Tuiuiú apresentou especificidade com o CBRZ014, por ter apresentado médias superiores quando inoculadas com a CIAT 899 nas características massa de nódulos inviáveis, massa de nódulos total e massa seca de parte aérea. Houve diferença na nodulação entre variedades locais e cultivares comerciais, onde a variedade preto tradicional se destacou com a melhor média em relação as demais para a característica porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV) e a também variedade, carioca tradicional para a massa seca total (MST). A bactéria nativa dos solos Curitibanenses, CBRZ014, se destacou por influenciar em uma maior relação raiz parte aérea nas plantas de feijão, sendo que esta característica pode ser levada em consideração em futuros programas de melhoramento.

Palavras chaves: *Phaseolus vulgaris*. Rizóbios. FBN.

ABSTRACT

In the common bean, nitrogen is the element absorbed in the greatest quantity, and this necessity may be explained due to the high protein content found in the grain. One of the main sources of supply of this nutrient to the plant is through biological nitrogen fixation (BNF). In the beans, the bacteria of the genus *Rhizobium* are associated symbiotically, forming specific structures in the root, called nodules, in which the FBN process occurs. Thereby, aimed to verify the difference in nodulation capacity between local varieties and commercial cultivars of common beans, inoculated with *Rizóbios* bacteria and with isolated from nodules of common beans in soils from the region of Curitibanos, Santa Catarina. The present work was carried out at the Federal University of Santa Catarina, Center for Rural Sciences, Curitibanos Campus. The experiment was conducted in a factorial scheme (2x4), in a randomized complete block design, with four replications where each replicate consisted of two vessels. Bean genotypes with different levels of domestication were analyzed, with two local varieties (Carioca and traditional black) and two improved commercial cultivars (TAA Dama and IPR Tuiuiu) which were inoculated with two isolates of bacteria, one commercial strain of the genus *Rhizobium*, the CIAT899, and one isolated in the nodules of common beans in soils of Curitibanos, the CBRZ014. Sowing was carried out in adapted Leonard vessels, irrigated with distilled water and autoclaved at the base of the vessel, according to the need of the culture. After the drop of cotyledons the application of nutrient solution of Hoagland, without nitrogen was initiated. The evaluations started at the full flowering of each bean genotype. The evaluations consisted of: mass of non-viable nodules, mass of viable nodules, mass of total nodules, percentage of viable nodules, root and aerial dry mass, total dry mass, foliar nitrogen content, nitrogen accumulation in the shoot and root-shoot ratio. Regarding the results obtained, it was possible to observe that the isolate CBRZ 014 promoted a greater root development in relation to CIAT 899, besides producing relatively high numbers of nodules. The traditional varieties were more efficient in the production of viable nodules and in the production of total dry mass. And the cultivar IPR Tuiuiu presented specificity with CBRZ014, because it presented higher means when inoculated with CIAT 899 in the characteristics dry mass of non-viable nodules, total nodule mass and dry mass of aerial part. There was a difference in nodulation between local varieties and commercial cultivars, where the traditional black variety stood out with the best average in relation to the others for the percentage of mass of viable nodules (PMNV) characteristic and also the traditional Carioca variety for the total dry mass (MST). The native bacterium from the soils of Curitibanos, the CBRZ014, stood out for producing a greater root-shoot ration, and this characteristic can be taken into account for future improvement programs.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobio*. FBN

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Vaso de Leonard adaptado. (B) A extremidade da garrafa protegida com algodão e gase. (C) sistema montado e envolto por jornal. (D) Vaso pronto para ser autoclavado.	20
Figura 2. Rega realizada na base do vaso.....	21
Figura 3. Florescimento pleno dos genótipos locais e comerciais de feijão comum.	23
Figura 4. (A) Tubos após passarem pelo destilador. (B) Titulação com ácido sulfúrico pra determinação do N na amostra.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendação de N para a cultura de feijão. Para expectativas de rendimento maior que 2,0 t ha ⁻¹ , acrescentar aos valores da tabela, 20 kg de N ha ⁻¹ , por tonelada de grãos a serem produzidos.	15
Tabela 2. Características dos genótipos de feijão avaliados no experimento.....	19
Tabela 3. Características das bactérias usadas no experimento.....	20
Tabela 4. Quadrados médios das características avaliadas em variedades locais e cultivares comerciais inoculadas com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba-SC, 2018.	25
Tabela 5. Quadrados médios das características avaliadas em variedades locais e cultivares comerciais inoculados com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba-SC, 2018.	26
Tabela 6. Comparação entre médias das bactérias avaliadas CIAT 899 e a RC014 em Curitiba-SC, 2018.	27
Tabela 7. Comparação entre médias entre os diferentes genótipos avaliados em Curitiba-SC, 2018.	28
Tabela 8. Comparação de médias nos diferentes genótipos avaliados, inoculados com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba-SC, 2018.	30
Tabela 9. Correlação de Pearson entre características avaliadas em genótipos de feijão inoculados com a bactérias do grupo dos rizóbios, em Curitiba-SC, 2018.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 O NITROGÊNIO NA CULTURA DO FEIJÃO	15
2.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) NA CULTURA DO FEIJÃO	16
2.3 GENÉTICA NA MELHORIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento rico em proteínas, carboidratos e nutrientes essenciais, por isso, é muito consumido entre os povos de países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, cujo grão faz parte da alimentação cotidiana. Culturas ricas em proteínas necessitam de uma porção maior de Nitrogênio (N) para um superior desenvolvimento e produtividade da planta. Sendo assim, o N é o nutriente mais limitante na cultura do feijão, além da sua fonte ser a mais cara e com elevado poder poluidor (ANDRAUS, 2014; DIAS, 2017).

As fontes que fornecem o N ao feijoeiro, podem advir diretamente do solo, pela decomposição da matéria orgânica, porém essa fonte é limitada, podendo ser esgotada em poucas safras. Pode ser decorrente também de fixação não biológica, através de descargas elétricas, combustão e vulcanismo, mas esta é uma fração pequena e variável quando comparada a necessidade das culturas. Além disso, o N pode ser fornecido pela adubação mineral, que devido a seu complexo processo de produção deixa o custo elevado, sem contar que devido à baixa eficiência de uso pelas plantas o mineral se torna um potencial poluidor, por perdas por lixiviação e volatilização. E por fim, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que se dá pela fixação do N atmosférico por bactérias que formam simbiose com as plantas, fornecendo o nutriente prontamente disponível (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001).

A FBN é uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade do feijoeiro, além de ser econômica e ecologicamente sustentável, pois reduz o uso de adubos nitrogenados, evitando contaminação e problemas ambientais de alto risco (ANDRAUS, 2014). Porém, quando compara-se o feijão com outras leguminosas como a soja (*Glycine max* L.) e o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), nota-se uma baixa capacidade de fixação biológica de N, o que leva a necessidade do uso de N mineral. Essa baixa eficiência pode ser atribuída a características ambientais, como temperatura e acidez do solo, características da cultura, como seu ciclo curto e a grande variabilidade genética que existe entre as cultivares de feijão em relação ao potencial de FBN e a características genéticas das próprias bactérias fixadoras (ALCANTARA et al., 2009). Andriolo, Pereira e Henson (1994) afirmam que linhagens silvestres de feijão, apresentam maior nitrogênio acumulado em comparação a cultivares consideradas eficientes na simbiose com *Rhizobium*. Bertoldo et al. (2015) também encontraram maior variabilidade genética para características relacionadas a nodulação em acessos de feijão, quando comparados as cultivares comerciais. As bactérias selecionadas presentes nos inoculantes comerciais,

podem não alcançar o seu máximo de potencial fixador, pois as populações nativas de bactérias presentes no solo, que já são amplamente adaptadas àquelas condições, podem se sobressair (SOARES et al., 2006).

Nesse sentido, sugere-se que variedades locais de feijão que não passaram por um amplo processo de melhoramento, possam apresentar alelos favoráveis a capacidade de nodulação em simbiose com rizóbios. Com isso há a possibilidade de selecionar genótipos que possam a vir futuramente participar de programas de melhoramento que visem a eficiência na fixação biológica combinado com características produtivas na planta.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a diferença na capacidade de nodulação entre variedades locais e cultivares comerciais de feijão comum, inoculadas com bactérias, uma estirpe comercial CIAT 899 do gênero *Rhizobium*, utilizada em inoculantes comerciais e com bactérias extraídas de nódulos de feijão comum, cultivado em solos da região de Curitibanos, Santa Catarina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O NITROGÊNIO NA CULTURA DO FEIJÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais alimentos no Brasil. Contudo, sua produção é considerada baixa, e isso pode se explicar pela não adoção de tecnologias e seu plantio em solos marginais (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013). Além disso, o feijão é uma planta de ciclo curto e apresenta raízes superficiais e pouco agressivas, o que dificulta a busca por nutrientes no solo (FONSECA, 2011). Para o crescimento e desenvolvimento ideal das plantas, alguns nutrientes como potássio, cálcio, magnésio, enxofre e fósforo são indispensáveis. No feijoeiro, o N é o elemento absorvido em maior quantidade. Parte dessa necessidade se explica pelo alto teor de proteína encontrado no grão. Sendo assim, caracteriza-se as fases de floração e enchimento de grãos, como críticas em relação a esse nutriente, sendo que sua deficiência causa amarelecimento das folhas e retardo no desenvolvimento, devido a diminuição da área fotossintética, além de resultar em baixa formação de vagens e grãos pequenos (ALVAREZ et. al, 2005; CASSINI; FRANCO, 2006; ANDROELA, 1992).

Segundo a Sociedade Brasileira de Ciências do Solo (2016), a recomendação da quantidade de N fornecida a cultura de feijão, está diretamente relacionada com a quantidade de matéria orgânica presente no solo (Tabela 1).

Tabela 1. Recomendação de N para a cultura de feijão. Para expectativas de rendimento maior que 2,0 t ha⁻¹, acrescentar aos valores da tabela, 20 kg de N ha⁻¹, por tonelada de grãos a serem produzidos.

Matéria orgânica do solo	Nitrogênio
%	Kg de N ha ⁻¹
< 2,5	70
2,6-5,0	50
>5,0	< 30

Fonte: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo (2016).

As principais fontes de N para o feijão provêm do solo, por meio da decomposição da matéria orgânica, pela aplicação de adubos nitrogenados e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), que nada mais é que uma simbiose entre planta e bactérias do grupo Rizóbio que são capazes de capturar o N₂ atmosférico que está fortemente estável, devido a sua tríplice ligação, e transformá-lo em formas prontamente disponíveis para as plantas em NH⁺₃ (ANDRAUS, 2014; ALCANTARA et al., 2009).

Epstein e Bloom (2004) relatam que para aumentar a produção, agricultores do mundo todo aplicam em torno de 80 toneladas cúbicas de fertilizantes nitrogenados por ano. Isso se explica, por que grande parte lixivia para águas subterrâneas, ou volta para a atmosfera por volatilização. Além disso, a aplicação de fertilizantes acaba deixando o custo de produção da cultura muito elevado e também sendo um grande poluidor ambiental, devido justamente a volatilização na forma de N_2 , que quando em excesso potencializa o efeito estufa. Por isso, justifica-se estudos para que as plantas sejam mais eficientes na obtenção deste nutriente.

2.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) NA CULTURA DO FEIJÃO

As principais vantagens da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é que esta é uma das formas mais baratas e eficientes de se obter suprimento de N para as culturas agrícolas. Além disso, não causa problemas ambientais como os causados pelo uso de adubos nitrogenados. A FBN é realizada por microrganismos procarióticos (bactérias), que possuem o complexo de enzimas dinitrogenase, que rompe a tripla ligação existente entre os dois átomos do nitrogênio atmosférico (N_2), reduzindo até amônia (NH_3), a mesma que é obtida no processo industrial. Nas plantas pertencentes a família das Fabaceae, as antigas leguminosas, as bactérias do gênero *Rhizobium* se associam simbioticamente, formando estruturas específicas na raiz, chamadas de nódulos, nos quais ocorre o processo de FBN. Nesses nódulos a amônia sintetizada é incorporada a íons de hidrogênio (H^+), ocorrendo a transformação para amônio (NH_4^+) que será distribuído a planta hospedeira e incorporados em ureídeos, aminoácidos e amidas, por exemplo. (NOGUEIRA; SILVA FILHO, 2010; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001).

As quantidades de N fixado variam de acordo com a planta, com a estirpe de bactéria e as condições de solo. Em soja, varia de 60 a 180, no feijão de 3 a 110 e na leucena até 600 kg de N ha^{-1} Ciclo⁻¹, demonstrando o potencial destes microrganismos de suprirem a necessidade do mineral nas culturas, diminuindo assim o uso de fertilizantes comerciais (NOGUEIRA; SILVA FILHO, 2010).

A FBN em leguminosas pode ser dividida em dois processos: a nodulação (nod) e a fixação de nitrogênio (fix). A nodulação se inicia logo após a germinação da semente, com o rizóbio aderido a semente ou presente no solo, e pode-se caracterizar como pré-infecção, quando a planta hospedeira libera sinais moleculares. Durante a germinação, a planta promove intensa exsudação de compostos fenólicos, que atuam na bactéria ativando os genes da nodulação (genes *nod*). O rizóbio passa a produzir compostos denominados fatores *nod*, que interagem com os pêlos radiculares, que modificam a sua morfologia, para que haja a adesão

das células do rizóbio. Após está adesão inicial, a bactéria penetra até as células corticais através de uma estrutura chamada cordão de infecção, onde no seu interior as células do rizóbio se multiplicam e então se adapta a sua função de fixador de nitrogênio, sendo chamado então de bacteróide. As células da planta passam a produzir proteínas específicas chamadas de nodulinas, destacando-se a leg-hemoglobina (Lhb), que se caracteriza por uma cor avermelhada no interior do nódulo. Após todos estes eventos, a nova estrutura formada está apta a iniciar seu trabalho de fixar nitrogênio (CASSINI; FRANCO, 2006).

O feijoeiro é um exemplo de leguminosa que tem a capacidade de fixar nitrogênio, quando em simbiose com rizóbio. Porém, estudos demonstram que esta associação, muitas vezes, não é efetiva no campo. Os solos brasileiros possuem uma infinidade de bactérias nativas capazes de nodular o feijão e nem sempre são eficientes neste processo. Além disso, esta cultura é altamente susceptível a estresses ambientais, como temperaturas elevadas, solos ácidos, solos pobres em matéria orgânica e nutrientes, deficiência hídrica e diversas doenças (STRALIOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2002). Em verdade, o feijão é considerado entre as leguminosas, a cultura com a menor eficiência de FBN, sendo que o suprimento de nitrogênio não passa dos 50%. A causa deste problema é um conjunto de fatos que afeta a simbiose (CASSINI; FRANCO, 2006).

2.3 GENÉTICA NA MELHORIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Quando uma planta é selecionada, mesmo que sem intenção comercial, ou seja, de forma empírica por produtores, o processo de seleção seleciona características importantes para garantir a sobrevivência naquele ambiente e o produtor opta por características desejáveis, ao ponto de vista comercial. Dessa maneira, alguns alelos de interesse vão sendo mantidos e outros eliminados. Portanto, acredita-se que genótipos locais ou crioulos podem possuir características interessantes para a FBN. Além disso, há uma grande variabilidade na capacidade de nodulação e na eficiência dessa simbiose entre as variedades de feijão (STRALIOTTO; TEIXEIRA, 2000; CARVALHO, 2000).

A herdabilidade para características referentes a nodulação no feijoeiro é baixa, devido a estas características serem de caráter quantitativo, governadas por vários genes, o que dificulta o processo de melhoramento em si, pois essas características sofrem uma forte influência ambiental (PERREIRA et al. 1993). Por isso, sugere-se dar importância a características que se correlacionem a eficiência simbiótica, pois estas não sofrem ação ambiental e indiretamente melhorariam a fixação. O número de nódulos e o peso de nódulos secos, são características

fenotípicas importantes para esses programas (KNUPP et al, 2017). Estudos mostram que a infecção da bactéria nas leguminosas, seja semelhante a algumas infecções por doenças, portanto, uma planta com maior susceptibilidade aos rizóbios, mais eficiente seria na FBN (STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G., 2000).

No Brasil, não foi conduzido para o feijoeiro, um programa de melhoramento forte e persistente que estudasse a FBN (SÁ, 1993) o que pode-se notar são pesquisas voltadas a produtividade, resistência a condições adversas e a doenças, porte e arquitetura (SOUZA et al., 2013), e todas as plantas foram sendo selecionadas com fornecimento de N. Trabalhos como o de Brito, Muraoka e Silva (2010) demonstram tanto no feijão comum, quando no caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) que conforme aumenta-se a dose de nitrogênio utilizada, diminui a fixação simbiótica de N. Segundo Barbosa e Gonzaga (2012), estudos dirigidos na região central do Brasil, demonstraram que a aplicação de nitrogênio mineral, seja na semeadura ou em cobertura, no sistema de semeadura direta ou convencional, em qualquer estágio em que a cultura se encontre, irá ser negativa a nodulação e a eficiência da fixação biológica. É evidente, que os programas de melhoramento do feijoeiro até o dado momento, se dedicaram a seleção de cultivares uniformes e mais produtivas, com resistência a pragas e doenças e um porte ereto para facilitar a colheita, qualidade nutricional na pós-colheita, ou seja, selecionando características de parte aérea da planta. Apesar da importância de um sistema radicular bem desenvolvido e vigoroso nas plantas, no feijoeiro, essa característica vem sendo negligenciada ao longo do tempo, o que também pode afetar a uma simbiose eficiente entre bactérias e planta (TSUTSUMI; BULEGON; PIANO, 2015; ZANELLA, 2016).

Vieira et al. (2010) relatam em seu trabalho com feijão caupi, a importância do uso de variedades locais ou de bancos de germoplasma junto com estirpes de Rizóbios eficientes, para aumentar a produção, levando em consideração que a principal fonte de N para a cultura é advinda da FBN, pois nossos solos são extremamente pobres desse nutriente. Além disso, a seleção de genótipo, deve ser feita com suplementação de N através da simbiose com bactérias e não mineral, para favorecer em escolha mais precisa do material (PEREIRA et al. 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos, no ano de 2018, onde se utilizou o Laboratório de Microbiologia para o preparo de materiais necessários e a casa de vegetação para conduzir o experimento. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (2x4), em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições onde cada repetição foi constituída de dois vasos.

Foram avaliados genótipos de feijão com níveis de domesticação diferentes, sendo duas variedades locais (pouca ou nenhuma seleção) e duas cultivares comerciais melhoradas (Tabela 2). As variedades locais foram doadas por produtores da região.

Tabela 2. Características dos genótipos de feijão avaliados no experimento.

Níveis de domesticação		Cor do grão	Tamanho do grão
Variedades	Preto tradicional	Preto brilhoso	Pequeno
	Carioca tradicional	Bege com estrias marrons	Pequeno
Cultivares	IPR Tuiuiú	Preto opaco	Pequeno
	TAA Dama	Bege claro, com estrias claras	Pequeno

Além disso, foram utilizados duas bactérias, a estirpe *Rhizobium tropici*, denominada de CIAT 899, que atualmente é uma das estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, considerada como padrão, e um isolado denominado CBRZ 014, isolado de nódulos de feijão cultivados em solos da região de Curitibanos, caracterizada morfolologicamente pelo grupo de pesquisa de Microrganismos Promotores de Crescimento Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, liderado pela professora doutora Glória Regina Botelho (Tabela 3), que segundo Lisot, (2017) destacou-se entre um dos isolados da coleção, que apresentou nodulação semelhante a estirpe CIAT 899.

Tabela 3. Características das bactérias usadas no experimento.

Bactéria	Cor	Aparência	Tempo de crescimento	pH	Gram
CIAT 899	Creme	Circular	Rápido	Ácido	Negativo
CBSRZ014	Creme	Circular	Rápido	Ácido	Negativo

Fonte: Adaptado Lisot, 2017.

Para o preparo do substrato foi utilizada uma mistura de vermiculita e areia, em uma proporção de 2:1, respectivamente. A areia foi previamente lavada por três dias e posteriormente seca em estufa, em uma temperatura de 110°C.

Foram utilizados vasos de do tipo Leonard adaptados (SANTOS, 2009) apresentados na Figura 1A, que foram previamente desinfetados em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 5%, por cinco minutos e em seguida lavados em água corrente. Na extremidade mais fina da garrafa foi colocado algodão e uma gaze (Figura 1B) para barragem do substrato, e todo o sistema foi envolto por jornal (Figura 1C). Só então o substrato era então acondicionado no vaso e posteriormente tampado com uma folha de jornal (Figura 1D). Na base da garrafa foi colocado 100 mL de água e o sistema era levado para a autoclave vertical, modelo Linha CS (Prismatec), para o processo de esterilização como um todo, com duração de 20 minutos à 1 atm de pressão.

Figura 1. (A) Vaso de Leonard adaptado. (B) A extremidade da garrafa protegida com algodão e gaze. (C) Sistema montado e envolto por jornal. (D) Vaso pronto para ser autoclavado.



Fonte: Autor

Dois dias antes da semeadura, foi preparado o meio de cultura LB líquido, para o crescimento das bactérias. Para o preparo de 400 mL, se utilizou 4g de triptona, 2,5 g de NaCl e 2,5 g de extrato de levedura. Em um Becker, foi adicionado 200 mL de água destilada, junto com todos os ingredientes descritos. O pH foi mantido em torno de 7,0. Posteriormente, adicionou os 200 mL restantes, e então divido o meio de cultura preparado, em 10 Becker menores, onde oito fora para cada tratamento e dois para utilizar na quantificação das bactérias. Além disso, foi preparada uma solução salina e o meio de cultura solido para realizar a diluição seriada para a contagem do número de unidade formadora de colônias (UFC). A solução salina consiste na mistura de NaCl na proporção de 90%, que foi dividida em tubos com 9 mL desta solução. O meio sólido é o mesmo citado anteriormente, com a diferença da adição de 15 g ágar. Todos os materiais citados acima, depois de misturados seguira para a autoclave, e junto com eles, também pinças, placas de petri e espátulas, que foram utilizadas na semeadura.

Depois que o meio estava autoclavado e resfriado, as bactérias foram inoculadas nele, com o auxílio de uma alça de platina e uma lamparina, para que estas pudessem crescer. Para isto, foram à estufa à temperatura de 28°C, onde permaneceram por 24 horas.

Posteriormente, as sementes de feijão foram previamente desinfetadas. Na câmara de fluxo laminar, foram lavadas em álcool 70% por 1 minuto, em seguida no hipoclorito (5%), por 1 minuto e então lavadas por 5 vezes em água destilada e autoclavada, e secas apenas deixando-as alguns minutos sobre uma placa de petri na câmara de fluxo. Depois de secas, estas foram colocadas com auxílio de uma pinça, em cada Becker com o inoculante, devidamente identificado com o nome do genótipo, permanecendo por 30 minutos.

A semeadura foi realizada nos vasos, na casa de vegetação, onde foram mantidos até o final do experimento. Com pinças embebidas em álcool 70% e flambadas se dava a semeadura, onde foram colocadas duas sementes por vaso, de cada genótipo, para posterior desbaste. O imediatamente após a emergência, deixando somente uma planta por vaso. Assim que semeadas, as sementes foram cobertas por areia. Após a semeadura, se iniciou a rega, com água destilada e autoclavada, depositada na base das garrafas (Figura 2). A rega foi realizada conforme a necessidade da cultura, ou seja, diariamente era feita a observação da disponibilidade de água.

Figura 2. Rega realizada na base do vaso.



Fonte: Autor

Na câmara de fluxo laminar, imediatamente após a semeadura, foi realizada a diluição seriada das bactérias, onde foi pipetado 1mL do inóculo e repassado a um tubo contendo a solução salina, sendo este primeiro chamado de 1×10^{-1} , e então deste tubo coletava-se 1 mL e passar para o tubo 1×10^2 e assim sucessivamente até o tubo 1×10^{10} . A partir do tubo 1×10^6 realizou-se o plaqueamento (em triplicata) das bactérias, ou seja, foi coletado de cada tubo 0,1 mL do líquido, colocado sobre a placa de petri com o meio LB, e com auxílio de uma alça de Drigalski, espalhado uniformemente a diluição. As placas foram então, levadas a uma estufa B.O.D. onde foram mantidas por 24 horas a 28°C . Depois deste período foi realizada a contagem do número de unidades de colônias formadas (UFC). Porém, devido ao grande número de bactérias por placa, não foi possível a contagem das bactérias, na data prevista. Este procedimento foi repetido posteriormente seguindo as mesmas condições.

Por ocasião da queda dos cotilédones, inicia-se a aplicação da solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (HOAGLAND; ARNON, 1950), uma vez por semana.

As avaliações se deram no florescimento pleno de cada genótipo (Figura 03), onde foram avaliadas a raiz e a parte aérea. Na parte radicular, o procedimento foi: a planta foi retirada do vaso e já em seguida separada da parte aérea. As raízes foram cuidadosamente retiradas do substrato e colocadas em sacos de papel, devidamente identificados e em laboratório lavadas sobre uma peneira para eliminar o máximo possível de substrato restante. Em seguida, os nódulos foram destacados da raiz sobre uma placa de petri com auxílio de uma pinça, e as placas mantidas identificadas, para então, se fazer as avaliações de: a) massa de nódulos totais (mg), através da pesagem dos nódulos, em balança analítica; b) massa de nódulos viáveis (ou ativos) e inviáveis (mg), através da verificação da coloração interna do nódulo, que quando ativo apresenta cor rosa intensa; (c) massa de nódulos total (mg); (d) porcentagem de massa de

nódulos viáveis (%), obtidos pela divisão do número de nódulos viáveis por número de nódulos total; (e) massa seca de raiz, (mg) e (f) relação raiz parte aérea, obtida pela divisão da massa seca da raiz, pela massa seca da parte aérea, resultado obtido em mg de raiz/ mg de parte aérea.

Figura 3. Florescimento pleno dos genótipos locais e comerciais de feijão comum.

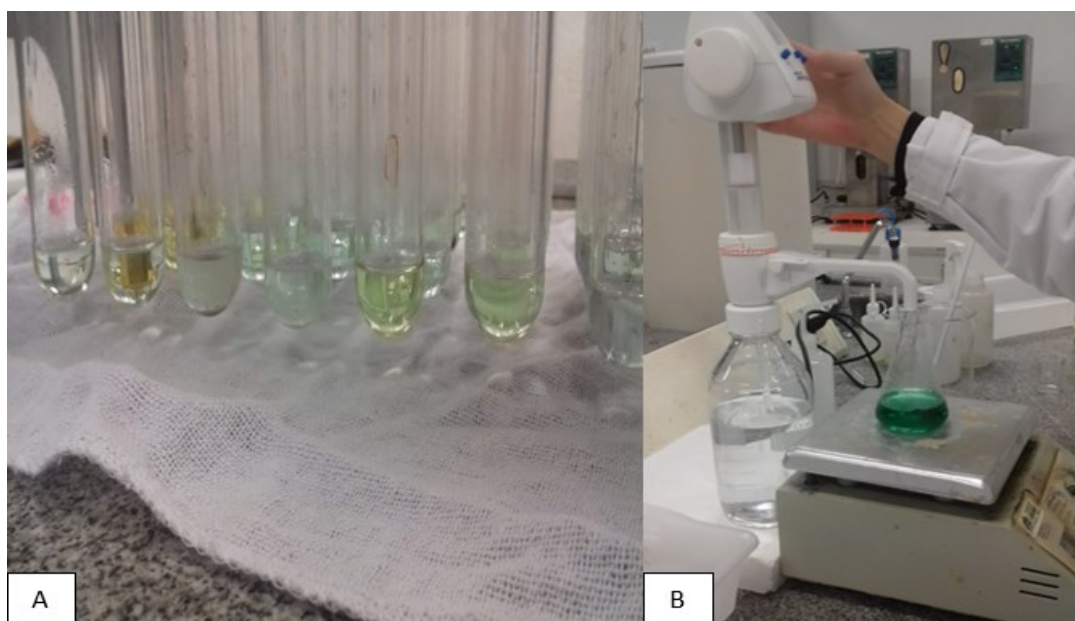


Fonte: Autor

Com relação à parte aérea, a mesma foi pesada e colocada em sacos de papel também identificados e posteriormente feita a secagem em estufa a 45°C, até todas as folhas ficarem secas, e foram então pesadas, obtendo-se a (g) massa seca da parte aérea (mg). Posteriormente se realizou a análise do (h) teor foliar de nitrogênio, dado em mg de N. grama⁻¹ de folha. Para a realização da análise de nitrogênio foliar se utilizou a metodologia de Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006), que se iniciou pela pesagem de 100 mg da amostra foliar, previamente moída e seca, que foi colocada em um tubo de digestão. Em seguida acrescentou 1 g da mistura de digestão (mistura de 10g de sulfato de potássio - K₂SO₄, 1 gramas de sulfato de cobre - CuSO₄.5H₂O e 0,1 g de selênio), 1 mL de peróxido de hidrogênio a 30% e 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). O tubo foi levado ao bloco digestor a 160°C, ficando nesta temperatura por meia hora, depois foi aumentado para 350°C. A partir do momento em que a solução clareou, ela foi mantida nesta mesma temperatura por uma hora (Figura 4A). Passado este tempo, os frascos foram retirados do bloco, sem deixar esfriar muito para que a solução não endurecesse, e colocados em água quente (70°C), e aos poucos transferia a amostra para frascos “snap cap”

onde foram deixados por uma hora de descanso. Após esse período, os tubos foram levados ao destilador, onde adicionou-se 10 mL de Hidróxido de sódio - NaOH (10M). Destilou-se até coletar 45 mL em um erlenmeyer de 125 mL, contendo neste, 5 mL da solução indicadora de ácido bórico. Esse erlenmeyer com o condensado, provido do destilador, foram então titulados, com uma solução de ácido sulfúrico (0,025 M) (Figura 4B), até que houve a mudança de cor de verde claro para rosa permanente. O volume de ácido gasto na titulação foi anotado e multiplicado pelo fator de correção 0,0014 que resultou no teor de N na amostra. E com esse resultado de teor de N foliar multiplicado pela massa seca da parte aérea, obteve-se (i) acúmulo de N na parte aérea, em mg de N. mg^{-1} de massa seca da parte aérea.

Figura 4. (A) Tubos após passarem pelo destilador. (B) Titulação com ácido sulfúrico pra determinação do N na amostra.



Fonte: Autor

Avaliou-se ainda ao final a (j) massa seca total em mg, obtida pela soma da massa seca de raiz e parte aérea.

Os dados das características avaliadas foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram estimadas as correlações entre as características Massa de nódulos inviáveis (MNI), massa de nódulos total (MNT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), através da análise de correlação de Pearson pelo teste t ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diluição seriada resultou em $2,20 \times 10^6$ UFC/mL da CIAT 899 e $1,26 \times 10^7$ UFC/mL da CBRZ 14, demonstrando que o número de UFC foi maior para o isolado CBRZ014, demonstrando que esta bactéria tem uma velocidade de crescimento superior a CIAT 899, dado que demonstra a eficiência da nativa em relação a estirpe.

A análise de variância e os quadrados médios para as características avaliadas durante o experimento, podem ser observadas nas Tabelas 4 e 5. Houve significância para o fator de variação bactéria, para as características massa de nódulos viáveis (MNV), massa seca total (MST), relação raiz parte aérea (RRPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). Para o fator genótipo, os quadrados médios das características porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV) e massa seca total (MST) apresentaram significância. Para as características massa de nódulos inviáveis (MNI), massa de nódulos totais (MNT) e massa seca da parte aérea (MSPA) os quadrados médios da interação bactéria x genótipos apresentaram significância, mostrando que houve comportamento diferencial dos genótipos quando inoculados com as diferentes bactérias.

Tabela 4. Quadrados médios das características avaliadas em variedades locais e cultivares comerciais inoculadas com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba-SC, 2018.

FV	GL	MNV	MNI	MNT	PMNV	MSPA	MSR	MST
Bactéria (B)	1	1,76*	5,87*	14,08*	0,74 ^{ns}	24,99*	0,22 ^{ns}	29,95*
Genótipo (G)	3	0,11 ^{ns}	0,72 ^{ns}	1,03 ^{ns}	824,09*	3,93*	0,13 ^{ns}	4,66*
B x G	3	0,40 ^{ns}	1,33*	2,62*	37,09 ^{ns}	2,94*	0,02 ^{ns}	3,45 ^{ns}
Bloco	3	0,20 ^{ns}	0,64 ^{ns}	1,50 ^{ns}	70,07 ^{ns}	1,34 ^{ns}	0,04 ^{ns}	1,72 ^{ns}
Resíduo	20	0,14	0,33	0,66	239,14	0,93	0,07	1,29
CV (%)		43,02	59,30	43,99	32,93	41,40	41,73	38,59

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹Nota: Massa de nódulos viáveis (MNV), massa de nódulos inviáveis (MNI), porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), e massa seca total (MST).

Tabela 5. Quadrados médios das características avaliadas em variedades locais e cultivares comerciais inoculados com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba-SC, 2018.

FV	GL	RRPA	TN	ANPA
Bactéria (B)	1	0,70*	181,12 ^{ns}	7622,33*
Genótipo (G)	3	0,08 ^{ns}	116,83 ^{ns}	1050,00 ^{ns}
B x G	3	0,09 ^{ns}	154,93 ^{ns}	192,11 ^{ns}
Bloco	3	0,06 ^{ns}	66,44 ^{ns}	1515,18 ^{ns}
Resíduo	20	0,07	55,26	463,13
CV (%)		68,71	48,87	54,67

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹ Nota: Relação raiz parte aérea (RRPA), relação parte aérea raiz (RPAR), teor de nitrogênio (TN) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).

Durante o início das avaliações deste experimento, pode-se notar que em grande parte dos tratamentos havia um elevado número de nódulos, chegando a apresentar em torno de 500 nódulos, o que condiz com os resultados de Knupp, Ferreira e Araújo (2017), que encontrou uma variação de 2 a 646 nódulos, nas avaliações de seus experimento que tinha como objetivo avaliar duas coleções de genótipos de feijão, quando a caracteres de nodulação nos dois grupos de domesticação do feijoeiro, Andino e Mesoamericano. No presente trabalho, optou-se por avaliar a massa fresca dos nódulos, separando os viáveis dos inviáveis, cujos resultados foram obtidos em miligramas (mg). Knupp, Ferreira e Araújo (2017), também encontrou uma massa de nódulos secos variando de 0,10 a 13,24 mg, enquanto neste experimento as massas frescas de nódulos variaram de 0,08 a 5,50 mg, porém em Knupp, Ferreira e Araújo (2017), avaliaram 686 genótipos de feijão, o que explica essa maior variação na massa de nódulos.

Na Tabela 6 observa-se que, com exceção da característica relação raiz parte aérea, para as demais, os genótipos de feijão apresentaram um valor médio superior quando inoculadas com a estirpe padrão CIAT 899 quando comparadas às inoculadas com o isolado CBRZ014. Isso pode ser justificado pelo fato de a estirpe padrão já ser conhecida (*R. tropici*) e ter passado por manutenções constantes ao longo do tempo, para manter sua eficiência (MARTÍNEZ et al., 1991), ao contrário do isolado CBRZ014, cujos estudos se iniciaram recentemente. Em Maringá, Rizzardi (2017) também observou a superioridade da CIAT 899 quando comparada a UFLA 02-100, sendo esta última uma estirpe de *Rhizobium etli* que foi coletada no estado de

Rondônia. Contudo, nota-se neste trabalho que para a característica relação raiz parte aérea, os genótipos inoculados com o CBRZ014, obtiveram uma média superior aos inoculados com o CIAT 899, o que pode ser um indicativo do potencial deste isolado para a FBN no feijoeiro, podendo este isolado ter efeito de promover a síntese de auxina, que favorece o desenvolvimento da raiz, sendo isto, de extrema importância, auxiliando a planta em momentos de estresse hídrico e na busca de nutrientes ajudando na manutenção na simbiose. Vários trabalhos relatam esse estímulo na síntese de auxina por bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo com rizóbios e principalmente bactérias do gênero *Azospirillum* (OLIVEIRA, 2009). Ferreira et al. (2009) também observou em seu trabalho o potencial de rizóbios nativos da região amazônica na nodulação do feijoeiro, onde foi avaliado cinco cepas de rizóbios na cultivar Talismã de feijão comum, sendo quatro nativas e a CIAT 899, onde os isolados não diferiram estatisticamente do rizóbio comercial para as características de massa seca de parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Estes fatos indicam que mais estudos devem ser direcionados a FBN no feijoeiro usando isolados provenientes de solos brasileiros, podendo assim aumentar a eficiência e o uso de inoculação na cultura.

Tabela 6. Comparação entre médias das bactérias avaliadas CIAT 899 e a RC014 em Curitiba- SC, 2018.

Bactérias	MNV (mg. Planta ⁻¹)	MST (mg. Planta ⁻¹)	RRPA (mg raiz. mg parte aérea ⁻¹)	ANPA (mg N. g parte aérea ⁻¹)
CIAT 899	1,114a*	3,96a	0,23b	57,19a
CBRZ014	0,637b	1,99b	0,53 ^a	21,55b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹ Nota: massa de nódulos viáveis (MNV), massa seca total (MST), relação raiz parte aérea (RRPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).

Analisando a diferença entre os genótipos de feijão (Tabela 7), é possível verificar que para a característica porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV), a variedade Preto tradicional se sobressaiu quando comparadas às demais, assim como na característica massa seca total (MST), onde também uma variedade, a Carioca tradicional, apresentou a maior média. Isso pode indicar o potencial das variedades locais para características relativas à capacidade de nodulação. O mesmo foi observado por Bertoldo (2015) que avaliou 25 genótipos do Banco de Germoplasma (BAG) da Fundação de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO/BAFFE), para caracteres inerentes a nodulação, onde destes, 19 eram acessos e seis cultivares comerciais. O autor notou que para as características de número de nódulos e

massa seca de raiz, os acessos apresentaram médias variadas entre eles, alguns superando as cultivares, onde estas mostraram-se semelhantes para estas características. Pasqualine (2008) avaliou 15 genótipos do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Santa Catarina em Lages, e comparou a cultivar Pérola, que apresenta alto potencial de nodulação. O autor avaliou estes diferentes genótipos com suprimento de nitrogênio mineral e biológico sendo este último feito com inoculante comercial do tipo turfoso, e constatou que alguns dos acessos do BAG apresentaram um maior número de nódulos quando comparadas à cultivar comercial.

Tabela 7. Comparação entre médias entre os diferentes genótipos avaliados em Curitiba-SC, 2018.

Genótipos	PMNV (%)	MST (mg.planta ⁻¹)
Preto tradicional	55,49a *	1,83b
IPR Tuiuiú	51,32ab	3,21ab
Carioca tradicional	48,94ab	3,53 ^a
TAA Dama	32,34b	3,30ab

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹Nota: Porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV) e massa seca total (MST).

Na Tabela 8, quando comparadas as duas bactérias dentro de cada genótipo é possível observar que para a característica massa de nódulos inviáveis (MNI), a cultivar TAA Dama obteve o maior valor médio quando inoculada com a bactéria CIAT 899 em relação a inoculação com a CBRZ014. Nos demais genótipos, não houve diferença para as duas bactérias. Quando se analisa os genótipos para cada bactéria, é possível notar que quando inoculadas com a bactéria CIAT 899, os genótipos se comportaram de forma diferente para a característica MNI, onde a cultivar TAA Dama e a variedade local Carioca tradicional, obtiveram os maiores valores de nódulos inviáveis. Já quando os mesmos genótipos de feijão foram inoculados com a CBRZ014, não houve diferença significativa. Vários autores citam em seus trabalhos que uma avaliação que deve ser levada em consideração é o tamanho do nódulo, pois muitas vezes os nódulos pequenos são inviáveis (HUNGRIA, et al. 1986; STAMFORD; NEPTUNE, 1979), o que não foi realizado neste trabalho.

Para a característica massa de nódulos total (MNT), na comparação das bactérias dentro de cada genótipo, é possível observar que a cultivar TAA Dama apresentou maior massa de

nódulos quando inoculada com a CIAT 899, porém grande parte destes eram inviáveis, como já dito anteriormente. O mesmo comportamento foi observado com a variedade local Preto tradicional, que obteve uma maior média de massa de nódulos total para inoculação com a CIAT 899, porém nesse caso sua maioria era viável, o que se torna interessante, pois a variedade obteve maior eficiência em nódulos ativos do que a cultivar. Esses resultados vão em sentido contrário aos de dos de Matoso e Kusdra (2014), que encontraram superioridade das bactérias nativas em relação a CIAT 899, na cultivar IPR 139 para a característica massa seca média unitária de nódulos secos e uma igualdade para o número total de nódulos.

Em relação à característica MNT, quando analisa-se a média entre os genótipos dentro de uma bactéria, nota-se que não houve diferença significativa quando estes genótipos foram inoculados com a CIAT 899, resultados que corroboram com Fonseca (2013), que observou que não houve diferença entre diferentes cultivares inoculados com a CIAT 899 para a característica de massa seca de nódulos. Porém quando inoculadas com a CBRZ014, a cultivar IPR Tuiuiú destacou-se, obtendo uma maior massa de nódulos total, que pode estar relacionado a uma possível especificidade desta cultivar com a bactéria nativa, ou seja, para esta cultivar a bactéria nativa é responsiva o suficiente ou até mesmo sendo superior a estirpe padrão, em várias características (Tabela 6). Resultado semelhante foi verificado por Silva (2011), que encontrou uma especificidade entre a variedade de feijão-caupi BRS Pujante, que se beneficiou mais da FBN quando inoculadas com a estirpe BR3267. Fonseca (2013) também observou em seu trabalho nas características teor de nitrogênio e acúmulo de nitrogênio na parte aérea, que a cultivar de feijão comum Madrepérola apresentou maior afinidade com a bactéria CIAT 899, demonstrando que a estirpe comercial teve um comportamento diferencial em relação a cultivar. Além disso, Hungria e Neves (1986) já observaram em seu trabalho a afinidade entre a cultivar Negro Argel com a estirpe CO5, cuja combinação obteve um maior acúmulo de nitrogênio total nas folhas, caule e vagens em relação as demais combinações, mostrando a especificidade de alguns genótipos de feijão com algumas bactérias.

Tabela 8. Comparação de médias nos diferentes genótipos avaliados, inoculados com a estirpe padrão CIAT 899 e o isolado CBRZ014 em Curitiba- SC, 2018.

Genótipos	MNI (mg. Planta ⁻¹)		MNT (mg. Planta ⁻¹)		MSPA (mg. Planta ⁻¹)	
	CIAT 899	CBRZ014	CIAT 899	CBRZ014	CIAT 899	CBRZ014
TAA Dama	2,30* Aa	0,35Ba	3,43Aa	0,85Bab	4,05Aa	1,45Ba
Carioca tradicional	1,27Aab	0,57Aa	2,40Aa	1,27Aab	4,62Aa	1,59Ba
IPR Tuiuiú	1,04Ab	1,08Aa	2,02Aa	2,16Aa	2,65Aab	2,20Aa
Preto tradicional	1,02Ab	0,20Aa	2,26Aa	0,47Bb	2,05Ab	0,60Ba

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹Nota: massa de nódulos inviáveis (MNI), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa nódulos total (MNT).

Avaliando as diferenças das bactérias em cada genótipo é possível observar que para a característica massa seca de parte aérea (MSPA), os genótipos TAA Dama, Carioca tradicional e Preto tradicional apresentaram maior média quando inoculadas com a CIAT 899. Como já comentado anteriormente, isto deve-se ao fato desta bactéria ser a recomendada no Brasil para a cultura do feijão, o que leva a uma maior adaptação da mesma. González (2008), encontrou resultados semelhantes, na inoculação do feijoeiro (cultivar Pérola), com estirpes isoladas em solos brasileiros e venezuelanos nas avaliações de número de nódulos, massa seca de plantas e porcentagem de nitrogênio na parte aérea, sendo que as médias foram estatisticamente equivalentes às estirpes comerciais (CIAT 899 e PRF-81). Fonseca (2013) também não encontrou diferença entre as estirpes avaliadas CIAT 899 e UFLA 04-173, sendo que ambas promoveram crescimento vegetativo do feijoeiro. Fica evidente que a CBRZ014 tem alto potencial como uma futura bactéria para fabricação de inoculantes para a cultura do feijoeiro. No presente trabalho, a cultivar IPR Tuiuiú, não diferenciou quando inoculada com ambas as bactérias, salientando o já discutido anteriormente, que a cultivar pode apresentar especificidade com o isolado nativo, sendo que quando usado na inoculação, promoveu o mesmo efeito da estirpe padrão, já melhorada. Entre os genótipos, dentro de cada bactéria, a cultivar Dama e a variedade Carioca Tradicional foram destaques com maior média quando inoculadas com a CIAT 899, já quando inoculados com a CBRZ014, os genótipos de feijão não diferiram entre si.

Na Tabela 9 estão apresentadas as correlações entre as características avaliadas. É possível observar que, houve uma alta correlação positiva entre MNI e MNT e entre MNV e

MNT, sendo que esta correlação já era esperada. Vale salientar que em trabalhos futuros é importante avaliar a viabilidade dos nódulos com seu respectivo tamanho, pois notou-se claramente que nódulos de menor tamanho eram inviáveis. Franco et al. (2002) relatam uma correlação positiva e significativa entre número de nódulos e massa seca de nódulos, porém relatam que algumas cultivares apresentaram diferenças na massa seca de nódulos, devido ao aumento do tamanho dos nódulos. Correlações positivas também foram verificadas para as características MNV e MSR, MSPA, MST sendo que a produção de nódulos eficientes contribui significativamente com o crescimento da planta, o que também foi observado por Pasqualine (2008) com massa de nódulos secos e massa seca de parte aérea apresentando correlações positivas e significativas com o crescimento do feijoeiro.

Tabela 9. Correlação de Pearson entre características avaliadas em genótipos de feijão inoculados com a bactérias do grupo dos rizóbios, em Curitiba-SC, 2018.

Caracteres	MNI	MNT	MSR	MSPA	MST	ANPA
MNV	0,61**	0,82**	0,59**	0,71**	0,72**	-
MNI		0,95**	0,47*	0,70**	0,69**	0,39*
MNT			0,57**	0,77**	0,78**	0,41*
MSR				0,64**	0,74**	0,48*
MSPA					0,99**	0,64**
MST						0,65**

**significativo ao nível de 1% e * ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

¹Nota: massa de nódulos inviáveis (MNI), massa de nódulos total (MNT), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA).

Correlações significativas e positivas foram observadas entre MNT, MSR, MSPA, MST e ANPA, que reflete que quanto maior a massa de nódulos totais, maior será a contribuição em acúmulo de massa seca, tanto de raiz como de parte aérea, o que é importante, pois uma maior matéria seca final pode ser resultado de mais solutos acumulados. Além disso, nota-se a correlação positiva entre MNT e ANPA, o que nos diz que houve acúmulo de nitrogênio na planta por FBN, já que não houve fornecimento mineral do mesmo as plantas. Stamford e Neptune (1979) também observaram a correlação positiva entre a massa de nódulos secos e o nitrogênio total absorvido pela planta.

Observa-se que houve uma correlação positiva também entre MSR e MSPA e MSR e MST o que demonstra que as massas secas se acumulam de forma semelhantes, não

necessariamente na mesma quantia em raiz e parte aérea, mas sim à medida que há acréscimo de massa em uma também há em outra. Também observou-se uma correlação positiva entre MSR e ANPA, isto é, conforme há um maior acúmulo de massa na raiz, o mesmo ocorre no nitrogênio na parte aérea, o que está claramente relacionado a FBN. Essa mesma correlação positiva foi observada por Matoso (2012).

A MSPA foi correlacionada positivamente com ANPA, e esta correlação demonstra que o desenvolvimento da planta é beneficiado quando há um aporte de nitrogênio, provavelmente devido ao aumento da área fotossintética da mesma, que acaba convertendo em acúmulo de solutos na planta. Matoso (2012) também observou que o número de nódulos e o acúmulo de nitrogênio em plantas de feijão inoculadas com bactérias promove o crescimento da planta.

No presente trabalho, foi possível observar que o isolado CBRZ014 apresentou um alto potencial de nodulação em plantas de feijoeiro por apresentar uma alta produção de nódulos, e além disso, a inoculação com a bactéria nativa apresentou um maior desenvolvimento radicular. Ademais, as variedades locais de feijão apresentaram características interessantes que favorecem a FBN como PMNV e MST, portanto esses genótipos devem ser mais estudados nas pesquisas desta área. Houve também uma relação de especificidade, comprovada pelo comportamento da cultivar comercial IPR Tuiuiú com o rizóbio nativo, o que indica que esta combinação deve ser melhor avaliada.

Com base no exposto, é possível afirmar que o estudo da FBN em variedades de feijão comum não ou pouco melhoradas e sem aporte de nitrogênio mineral, pode ser um caminho eficiente para a seleção de genótipos de feijão comum com maior capacidade de nodulação, e vir futuramente a aumentar a eficiência simbiótica planta/bactéria, diminuindo assim o uso de adubos minerais e sua contaminação ambiental, o custo para os produtores e o aumento de produção.

5 CONCLUSÃO

Houve diferença na nodulação entre variedades locais e cultivares comerciais, onde as variedades tiveram comportamento superior em relação às cultivares comerciais, a exemplo da variedade preto tradicional que se destacou para a característica porcentagem de massa de nódulos viáveis (PMNV), e a variedade carioca tradicional que se destacou para a característica massa seca total (MST).

O isolado de nódulos de feijão comum em os solos Curitibanenses, CBRZ014, se destacou por em simbiose com as plantas de feijão produzir a maior relação raiz parte aérea, sendo que esta característica pode ser levada em consideração a futuros programas de melhoramento.

A cultivar comercial IPR Tuiuiú apresentou especificidade com o isolado CBRZ014, ao apresentar comportamento diferencial em relação aos demais genótipos para as características massa de nódulos total (MNT) e massa seca de parte aérea (MSPA), quando inoculados com as duas bactérias.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, R. M. C. M. et al. **Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos**. Teresina: Embrapa, 2009. 27 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/36605/1/doc197.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2018.
- ALVAREZ, A. C. C. et al. Resposta do feijoeiro à aplicação de doses e fontes de nitrogênio em cobertura no sistema de plantio direto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.69-75, 11 abr. 2005. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.1927>. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1927>>. Acesso em: 12 fev. 2018.
- ANDRAUS, M. P. **Nodulação de cultivares de feijoeiro-comum influenciada por diferentes ciclos de crescimento**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Solo e água, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3620>>. Acesso em: 05 fev. 2018.
- ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P. A. A.; HENSON, R. A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto a características relacionadas com a fixação biológica de N₂. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p.831-837, jun. 1994. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4122>>. Acesso em: 09 abr. 2018.
- ANDROELA, F. Fixação simbiótica de nitrogênio pelo feijoeiro. In: EMPRESA Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina. **A cultura do feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1992. Cap. 7. p. 137-143.
- ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância Agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 236 p.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2012. 247 p.
- BERTOLDO, J. G. et al. Evaluation of bean access to agronomic traits for use in breeding program. **Ambiência**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.295-306, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/ambiencia.2015.02.02>. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/2571>>. Acesso em: 09 abr. 2018.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-215, 2 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90818713027>>. Acesso em: 21 jan. 2018.
- CARVALHO, E. A. **Avaliação agrônômica da disponibilização de nitrogênio a cultura de feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-03042003-153318/pt-br.php>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação Biológica de Nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Ufv, 2006. Cap. 7. p. 143-170.

DIAS, P. A. S. **Potencial genético de linhagens elite de feijoeiro-comum para fixação biológica de nitrogênio**. 2017. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de, Goiânia, 2017. Disponível em:

<https://pgmp.agro.ufg.br/up/237/o/Tese_Polianna_Dias_vers%C3%A3o_final.pdf>. Acesso em: 02. Abr. 2018.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2004. 401 p.

FERREIRA, P. A. A. et al. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p.2210-2212, out. 2009. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n7/a299cr928.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2018

FONSECA, G. G. et al. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 9, n. 6, p.1778-1787, dez. 2013.

FONSECA, G. G. **Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio em minas gerais**. 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia/fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FRANCO, Marília Caixeta et al. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p.1145-1150, ago. 2002.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá: Embrapa, 2006. 9 p. (Circular técnica 63). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37465/1/CT63.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

GONZÁLEZ, T. O. **Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. **The water culture methods for growing plants without soil**. Berkeley, California Agriculture Experiment Station, 1950. 32p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. Curricular técnica n. 35.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. 2001. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **Tecnologia de fixação biológica de nitrogênio com o feijoeiro: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas**. Londrina, 2013.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Interações entre cultivares de *phaseolus vulgaris* e estirpes de rhizobium na fixação e transporte de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 21, p.127-140, fev.

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B.; ARAÚJO, A. P. Variability of nodulation traits in Andean and Mesoamerican common bean gene pools. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.252-260, abr. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000400005>.

LISOT, J. **Caracterização e seleção de rizóbios isolados do planalto catarinense para inoculação em feijoeiro - comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2017. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2017.

MATOSO, S. C. G.; KUSDRA, J. F. Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p.567-573, jan. 2014.

NOGUEIRA, A. V.; SILVA FILHO, G. N. Ciclo dos elementos químicos. In: **Microbiologia**. Florianópolis: Ufsc, 2010. Cap. 10. p. 156-161.

OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbiótica de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PASQUALINI, D. **Potencial da fixação biológica de nitrogênio em feijão em função da diversidade de bactéria e da planta**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2008.

PEREIRA, H. S. et al. Common bean elite lines cultivated under nitrogen fertilization and inoculation with *Rhizobium tropici*. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.2168-2173, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141135>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015001202168>. Acesso em 30 jan. 2018.

PEREIRA, P.A.A. et al. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Plant and Soil**, 148: 203-209, 1993.

RIZZARDI, D. A. et al. Generalized mixed linear modeling approach to analyze nodulation in common bean inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 52, n. 12, p.1178-1184, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017001200006>.

SÁ, N.M.H. et al. Selection and characterization of *Rhizobium* spp. strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Microbiologia**. v.24, p.38-48, 1993. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67112/1/Selection-characterization.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2018.

SILVA, M. F. et al. Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.1418-1425, nov. 2012. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832012000500005>.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (mg): ii – feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência**

do Solo, Lavras, n. 30, p.803-811, set. 2006. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v30n5/06.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO SOLO (Rio Grande do Sul/ Santa Catarina). Sociedade Brasileira de Ciências do Solo (Ed.). **Manual de Calagem e Adubação**: para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 11. ed. Núcleo Regional Sul: Comissão Química de Fertilidade do Solo, 2016. 376 p.

SOUZA, T. L. P. O. de et al. **Cultivares de feijão comum da Embrapa e parceiros disponíveis para 2013**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2013. 6 p.

STAMFORD, N. P.; NEPTUNE, A. M. L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação com quatro cultivares de *Vigna unculata* (L). Walp. **Cad. Ômega Univ. Fed. Rural Pe**, Recife, v. 3, n. 12, p.25-34, dez. 1979

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. **A Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L)**: aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 59p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos, 126). Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/622534/1/doc126.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. **Fixação biológica de nitrogênio**: In: AIDAR, H.; KLUTHOCOUSKI, J.; STONE, L.F. eds. Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Arroz e Feijão, 2002. p.123-153.

TSUTSUMI, C.Y; BULEGON, L.G.; PIANO, J.T. Melhoramento Genético do Feijoeiro: Avanços, Perspectivas e Novos Estudos, no Âmbito Nacional. **Nativa**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.217-223, 29 set. 2015. Revista Nativa. <http://dx.doi.org/10.14583/2318-7670.v03n03a12>.

VIEIRA, C. et al. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: Ufv, 2005. p. 301-391.

VIEIRA, C. L. et al. Inoculação de variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p.1170-1175, ago. 2010. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v14n11/v14n11a06.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. In: SANTOS, C. E. R, S. et al. **Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet**. Comunicado técnico 124. EMBRAPA, 2009.

ZANELLA, G. L. **Sistema radicular no melhoramento genético do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**.2016. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016. Disponível em:
<http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/871/dissertacao_gilberto_zanella_final.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.